

①⑨ BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENTAMT

⑫ **Offenlegungsschrift**
⑪ **DE 3922666 A1**

⑳ Aktenzeichen: P 39 22 666.2
㉑ Anmeldetag: 10. 7. 89
㉒ Offenlegungstag: 22. 3. 90

⑥① Int. Cl. 5:
A61K 35/78

A 61 K 31/70
A 61 K 31/365
// G01N 33/53

DE 3922666 A1

BEST AVAILABLE COPY

③⑩ Unionspriorität: ③② ③③ ③①
16.09.88 JP 231668/88

⑦① Anmelder:
Toyota Perfumery Co., Ltd., Tokio/Tokyo, JP

⑦④ Vertreter:
Solf, A., Dr.-Ing., 8000 München; Zapf, C., Dipl.-Ing.,
Pat.-Anwälte, 5600 Wuppertal

⑦② Erfinder:
Hasegawa, Shin, Pasadena, Calif., US; Lam, Luke
K.T., North Oaks, Minn., US

⑤④ Antitumor-Mittel

Die Erfindung betrifft ein spezifisches Citrus-Limonoid,
wie z. B. Limonin und Nomilin, das aus der Citrusfrucht iso-
liert werden kann und sich als brauchbar für die Behandlung
eines Tumors erwiesen hat. Es kann auch als Lebensmittel-
zusatz verwendet werden.

DE 3922666 A1

ATTORNEY DOCKET NUMBER: 11592-006-999
SERIAL NUMBER: 10/088,664
REFERENCE: B14

①⑨ BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENTAMT

⑫ **Offenlegungsschrift**
⑪ **DE 3922666 A 1**

⑳ Aktenzeichen: P 39 22 666.2
㉒ Anmeldetag: 10. 7. 89
㉔ Offenlegungstag: 22. 3. 90

⑤① Int. Cl. 5:
A 61 K 35/78
A 61 K 31/70
A 61 K 31/365
// G 01 N 33/53

DE 3922666 A 1

③⑩ Unionspriorität: ③② ③③ ③①
16.09.88 JP 231668/88

⑦① Anmelder:
Toyota Perfumery Co., Ltd., Tokio/Tokyo, JP

⑦④ Vertreter:
Solf, A., Dr.-Ing., 8000 München; Zapf, C., Dipl.-Ing.,
Pat.-Anwälte, 5600 Wuppertal

⑦② Erfinder:
Hasegawa, Shin, Pasadena, Calif., US; Lam, Luke
K.T., North Oaks, Minn., US

⑤④ **Antitumor-Mittel**

Die Erfindung betrifft ein spezifisches Citrus-Limonoid, wie z. B. Limonin und Nomilin, das aus der Citrusfrucht isoliert werden kann und sich als brauchbar für die Behandlung eines Tumors erwiesen hat. Es kann auch als Lebensmittelzusatz verwendet werden.

DE 3922666 A 1

Beschreibung

Die Erfindung betrifft ein Antitumor-Mittel aus der Gruppe der Citrus-Limonioide. Sie betrifft insbesondere eine pharmakologische Zusammensetzung, die eine therapeutisch wirksame Menge eines Citrus-Limonoids und einen pharmakologisch akzeptablen Träger enthält, und deren Verwendung in einem Verfahren zur Behandlung eines Tumors.

Limonin und Nomilin kommen zusammen mit anderen Limonoiden in Rutaceen-Pflanzen vor, welche gewöhnliche eßbare Früchte umfassen, wie Orangen, Zitronen, Limonen und Grapefruit. Die Molekülstruktur der Limonoide enthält einen Furanrest, an den in der 3-Position ein stark oxidiertes Triterpen gebunden ist. Furan enthaltende Naturprodukte, wie Kahweol und Cafestol, die aus grünen Kaffeebohnen isoliert wurden, inhibieren, wie gefunden wurde, die chemisch induzierte Neoplasie. Die Inhibierungswirkung dieser und anderer Klassen von Anticarcinogenen wird mindestens zum Teil ihrer Fähigkeit zugeschrieben, eine erhöhte Aktivität des Detoxifizierungsenzyms Glutathion-S-Transferase (GST) zu induzieren (vgl. V.L. Sporn, P.L. Venegus und L.W. Wattenberg in "J. Natl. Cancer Inst.", 68, 483-496 (1982), und A.M. Benson, R.P. Batzinger, S.Y.L. Ou, E. Bueding, Y.N. Cha und P. Talalay in "Cancer Res.", 38, 4486-4495 (1978)). Der Furanrest in Kahweol und Cafestol wurde als funktionelle Gruppe ermittelt, die verantwortlich ist für die Induktion der erhöhten GST-Aktivität bei Versuchstieren (vgl. L.K.T. Lam, V.L. Sporn und L.W. Wattenberg in "J. Med. Chem.", 30, 1399-1403 (1987)).

Da Limonoide, wie z.B. Limonin und Nomilin, Furan enthaltende Naturprodukte sind, die von der allgemeinen Bevölkerung regelmäßig verzehrt werden, wurde die GST-induzierende Aktivität dieser Limonoide gefunden und es wurde festgestellt, daß die zuletztgenannte Verbindung ein starkes Enzym-Induktionsmittel ist, während die zuerstgenannte Verbindung nur schwach aktiv ist. In dieser Untersuchung wird die Enzym-induzierende Aktivität in Korrelation gesetzt zur Inhibierung des durch BP induzierten Vordermagen-Tumors durch Limonin und Nomilin bei ICR/Ha-Mäusen.

Die vorliegende Erfindung betrifft eine pharmakologische Zusammensetzung, die eine pharmakologisch wirksame Menge eines Citrus-Limonoids und einen pharmakologisch akzeptablen Träger enthält.

Unter den Citrus-Limonoiden sind Limonin und Nomilin besonders wirksam. Diese Zusammensetzung ist brauchbar für die Behandlung eines Tumors.

Die vorliegende Erfindung betrifft ferner ein Verfahren zur Behandlung eines Krebses, das heißt, zur Behandlung und Inhibierung eines Tumors durch Verabreichung einer pharmakologisch wirksamen Menge eines Citrus-Limonoids an einem Patienten, der an Krebs und einem Tumor leidet.

Die erfindungsgemäß verwendeten Citrus-Limonioide sind verwendbar als Antitumor-Mittel.

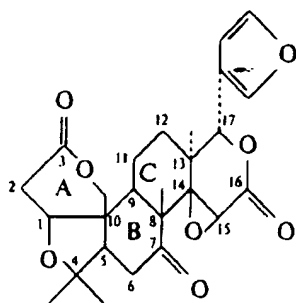
Die Erfindung betrifft außerdem die Verwendung der Citrus-Limonioide als Antitumor-Mittel und ihre Verwendung zur Herstellung eines Antitumor-Mittels.

Erfindungsgemäß wird das obengenannte spezifische Citrus-Limonoid, wie z.B. Limonin und Nomilin, aus der Citrusfrucht isoliert und ist, wie gefunden wurde, brauchbar zur Behandlung eines Tumors. Es ist auch brauchbar als Lebensmittel-Zusatz. Es dient als bitterschmeckende Komponente.

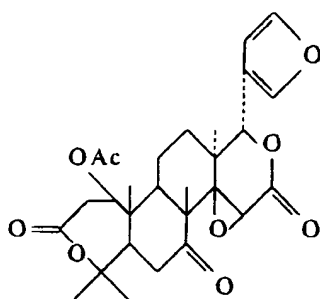
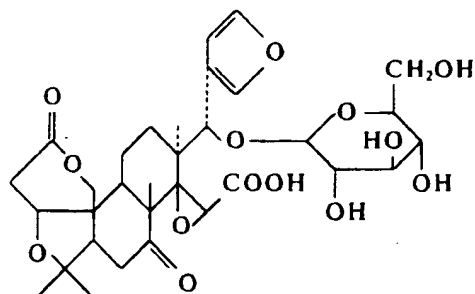
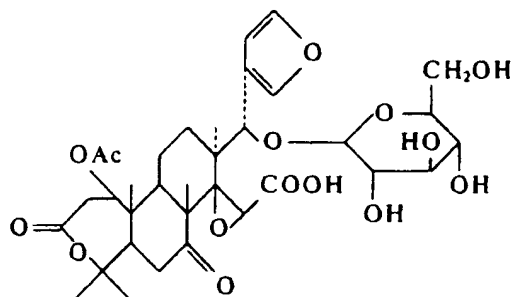
Die vorliegende Erfindung ist besonders nützlich zur Behandlung, Inhibierung und Verhinderung des Magen-Tumors.

Es sind 37 Arten von Limonoiden aus der Citrusfrucht erhältlich und sie weisen, wie gefunden wurde, in ihrer jeweiligen Struktur eine Furangruppe auf. Unter den Limonoiden wurden Limonin und Nomilin als die wirksamsten Komponenten isoliert. Limonin und Nomilin sind durch die nachstehend angegebenen Formeln (1) und (2) definiert. In ihren Strukturen ist die Furangruppe in ihrer 3-Position an eine stark oxidierte Triterpen-Gruppe an der C-17-Position gebunden. Sie liegen in der Citrusfrucht auch in kombinierter Form mit Glucose vor, wie durch die nachstehend angegebenen Formeln (3) und (4) dargestellt.

(1) Limonin



(2) Nomilin

(3) Limonin 17-O- β -D-glucopyranosid(4) Nomilin 17-O- β -D-glucopyranosid

Die Limonoide, wie Limonin und Nomilin, sind die bitteren Prinzipien (Grundstoffe), die in den gewöhnlichen eßbaren Citrusfrüchten vorkommen. Wenn Nomilin alle 2 Tage dreimal in einer Menge von 5 und 10 mg pro Tier verabreicht wird, induziert es eine erhöhte Glutathion-S-Transferase-Aktivität, 2,48 bzw. 3,44 mal so stark wie die Kontrolle in der Leber von weiblichen ICR/Ha-Mäusen. Die Erhöhung der GST-Aktivität in der Dünndarm-Schleimhaut betrug das 3,00fache bzw. 4,17fache derjenigen der Kontrolle. Bei der Verabreichung von Limonin in den gleichen Dosen war es in der Leber nicht aktiv. Es wurde jedoch eine geringe Aktivität in der Dünndarm-Schleimhaut festgestellt. Es wurde gefunden, daß das aktivere Enzym-induzierende Mittel Nomilin, die durch

Benzo(a) pyren-induzierte Neoplasie im Vormagen von ICR/Ha-Mäusen inhibiert. Die Anzahl der Mäuse mit einem Tumor wurde von 100% auf 72% vermindert und die Anzahl der Tumoren pro Maus wurde signifikant erniedrigt als Folge der Nomilin-Behandlung. Limonin, das ein schwaches Enzym-induzierendes Mittel ist, war weniger wirksam als Inhibitor der Benzo(a)pyren-induzierten Neoplasie. Dies legt nahe, daß Limonoide als eine Klasse von regelmäßig verzehrten Naturprodukten wirksame Chemoprophylaxemittel darstellen können.

Wenn die erfindungsgemäße Verbindung als Antitumor-Mittel verwendet wird, wird sie in der Regel oral oder parenteral (intramuskulär oder subkutan) verabreicht. Die Dosis unterliegt keinen speziellen Beschränkungen und variiert in Abhängigkeit vom Typ der Erkrankung, von den Symptomen, dem Alter, dem Zustand und Körpergewicht des Patienten, einer anderen Behandlung, die eventuell gleichzeitig mit dieser Behandlung durchgeführt wird, der Häufigkeit der Behandlung und der Qualität des gewünschten Effekts. Wenn sie oral an Erwachsene verabreicht wird, beträgt die Dosis in der Regel etwa 1 bis etwa 100 mg, vorzugsweise etwa 2 bis etwa 20 mg, insbesondere etwa 8 bis etwa 10 mg pro Tag. Sie wird einmal oder mehrmals am Tage verabreicht. Wenn sie durch Injektion verabreicht wird beträgt die Dosis etwa 0,01 bis etwa 1 mg/kg, vorzugsweise etwa 0,03 bis etwa 0,1 mg/kg.

Das erfindungsgemäße Mittel kann beispielsweise in Form von Pulvern, feinen Körnchen, Granulaten, Tabletten, Kapseln, Suppositorien oder Injektionspräparaten vorliegen. Bei der Formulierung wird ein üblicher Träger verwendet und es wird ein übliches Herstellungsverfahren angewendet.

Ein orales festes Präparat wird hergestellt durch Zugabe eines Exzipienten und, falls erforderlich, eines Bindemittels, eines Desintegrators, eines Gleitmittels (Schmiermittels), Färbemittels, Korrektionsmittels und dgl., zu dem aktiven Bestandteil (Wirkstoff) und Formen der Mischung zu Tabletten, beschichteten Tabletten, Granulaten, eines Pulvers oder Kapseln unter Anwendung eines üblichen Verfahrens.

Die Exzipienten umfassen beispielsweise Lactose, Maisstärke, weißen Zucker, Glucose, Sorbit, kristalline Cellulose und Siliciumdioxid. Die Bindemittel umfassen beispielsweise Polyvinylalkohol, Polyvinyläther, Ethylcellulose, Methylcellulose, Akaziengummi, Tragant-Gummi, Gelatine, Schellack, Hydroxypropylcellulose, Hydroxypropylstärke und Polyvinylpyrrolidon. Die Desintegrationsmittel umfassen beispielsweise Stärke, Agar, Gelatinepulver, kristalline Cellulose, Calciumcarbonat, Natriumhydrogencarbonat, Calciumcitrat, Dextrin und Pektin. Die Schmier- bzw. Gleitmittel umfassen beispielsweise Magnesiumstearat, Talk, Polyethylenglycol, Siliciumdioxid und gehärtete pflanzliche Öle. Die Färbemittel umfassen beispielsweise solche, wie sie als Färbemittel für Arzneimittel zulässig sind. Die Korrekturmittel umfassen beispielsweise Kakaopulver, Menthol, aromatisches Pulver, Pfefferminzöl, Borneol und Zimtpulver. Diese Tabletten und Körnchen können zweckmäßig mit Zucker, Gelatine und dgl. beschichtet sein.

Bei der Herstellung des Injektions-Präparats werden Zusätze, wie z.B. pH-Einstellmittel, Puffermittel, Stabilisatoren oder Solubilisatoren, erforderlichenfalls zu dem aktiven Bestandteil (Wirkstoff) zugegeben und ein intravenöses Injektionspräparat wird unter Anwendung eines üblichen Verfahrens daraus hergestellt.

Pharmakologischer Test

Limonin und Nomilin wurden jeweils getestet im Hinblick auf ihr potentiell Enzym-Induzierungsvermögen und ihr Vermögen, einen durch Benzopyren induzierten Magentumor zu inhibieren.

BP (Benzo(a)pyren) und CDNB (1-Chloro-2,4-dinitrobenzol) wurden von der Firma Aldrich Chemical Co., Milwaukee, WI, USA, bezogen. 3-BHA (3-tert-Butyl-4-hydroxyanisol) wurde durch Umkristallisation aus handelsüblichem BHA (bezogen von der Firma Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) gereinigt. Glutathion wurde von der Firma Sigma Chemical Co. bezogen. Limonin und Nomilin wurden aus Grapefruitsamenkörnern wie nachstehend angegeben isoliert. Samenkörnermehle wurden mit Hexanen gründlich gewaschen und die Limonoide wurden mit Aceton extrahiert. Limonin wurde durch fraktionierte Kristallisation aus dem Gemisch in Dichlormethan erhalten und Nomilin wurde durch Kristallisation aus dem Rückstand in Aceton erhalten. Ihre Strukturen wurden durch NMR-Spektralanalyse bestätigt.

Cytosol-Herstellung

Weibliche ICR/Ha-Mäuse mit einem Alter von 8 Wochen aus dem Harlan Sprague Dawley-Laboratorium (Indianapolis, IN, USA) wurden mit einer halbgereinigten Diät (ICN Nutritional Biochemical, Cleveland, OH, USA) eine Woche lang gefüttert, bevor sie in experimentelle Gruppen und Kontrollgruppen — jeweils drei Mäuse pro Gruppe — aufgeteilt wurden. Den experimentellen Gruppen wurden drei Dosen der Testverbindungen, suspendiert in Baumwollsaamenöl, jeden zweiten Tag verabreicht. Der Kontrollgruppe wurde Baumwollsaamenöl allein verabreicht. 24 Stunden nach der letzten Intubation wurden die Mäuse durch Cervicaldislokation getötet und die Leber, die Lunge, der Vormagen und die Schleimhaut des vorderen Drittels des Dünndarms wurden entnommen für die Enzymherstellung. Die Gewebe wurden in einer 1,15%igen KCl-Lösung mittels eines Brinkman-Homogenisators homogenisiert. Das Cytosol wurde nach einstündigem Zentrifugieren mit 100000 g erhalten und bis zur Verwendung bei -80°C eingefroren. Die Proteinkonzentration der Proben wurde nach der Lowry-Methode bestimmt. Jede Probe repräsentiert ein Gewebe aus jedem einzelnen Tier.

GST-Assay

Die Aktivität des cytosolischen GST wurde nach der Methode von Habig et al bestimmt unter Verwendung von CDNB als Substrat. Die Reaktionsrate wurde bei 340 nm in einem Hewlett Packard HP 8450 A-Spektrophotometer überwacht. Es wurden Assays bei 30°C in einem 0,1 M Phosphat-Puffer mit pH 6,5 in Gegenwart von 5 mM GSH und 1 mM CDNB durchgeführt. Als Kontrolle wurde ein vollständiges Assay-Gemisch ohne Enzym

verwendet.

Tumor-Inhibierung

Es wurden Tumor-Inhibierungs-Versuche durchgeführt unter Anwendung vorveröffentlichter Verfahren. 120 weibliche ICR/Ha-Mäuse (Harlan Sprague Dawley, Indianapolis, IN, USA), mit einem Alter von 8 Wochen wurden gleichmäßig in 6 Gruppen aufgeteilt. Den Mäusen wurde eine Woche vor Beginn des Versuchs eine halbgereinigte Diät verabreicht und sie wurden bis 3 Tage nach der letzten Dosis der Carcinogen-Behandlung mit der gleichen Diät gefüttert. BP wurde 2 mal pro Woche 4 Wochen lang in einer Menge von 1 mg (in 0,2 mL Maisöl) pro Dosis durch p.o.-Intubation verabreicht. Die Inhibitoren wurden durch p.o.-Intubation dreimal pro Woche an den anderen Tagen als die Carcinogen-Behandlung verabreicht. Es wurden drei zusätzliche Dosen von Inhibitoren, zwei vor der ersten Dosis und eine nach der letzten Dosis des Carcinogens, verabreicht. Drei Tage nach der letzten Dosis von BP wurden die Tiere bis zur Beendigung des Versuchs wieder mit normalem Laborfutter gefüttert. 18 Wochen nach der ersten Dosis von BP wurden die Mäuse getötet und die Mägen wurden entnommen und durch i.g.-Injektion von Formalin fixiert. Dann wurden sie in Längsrichtung aufgeschnitten. Die Tumoren des Vormagens wurden unter einem Präparier-Mikroskop mit einer Millimeter-Skala ausgezählt. Tumoren, die größer als 0,5 mm waren, wurden aufgezeichnet und histopathologisch untersucht.

Statistische Analyse

Die Signifikanz der Anzahl der Tumoren tragenden Mäuse wurde nach dem Chi Square-Test analysiert. Die Anzahl der Tumoren pro Maus und die Enzym-Assay-Statistiken wurden nach dem Student's-t-Test analysiert.

Ergebnisse

Die nachfolgende Tabelle I zeigt die induzierenden Effekte von Limonin und Nomilin auf die Aktivität von GST in der Leber und in der Dünndarm-Schleimhaut von ICR/Ha-Mäusen. In beiden Geweben wurde das bekannte Enzym-Induzierungsmittel und Anticarcinogen BHA als positive Kontrolle verwendet. Nomilin induzierte bei 5 und 10 mg pro Dosis eine erhöhte GST-Aktivität, die um den Faktor 2,48 bzw. 3,44 höher war als die Kontrolle in der Leber der Maus. Bei den gleichen Dosiswerten war Limonin nicht aktiv. In der Dünndarm-Schleimhaut, die ein empfindlicheres Gewebe in bezug auf das Ansprechen auf Induktionsmittel darstellt, waren die erhöhten Aktivitäten von GST durch 5 und 10 mg Nomilin jeweils um den Faktor 3,00 bzw. 4,17 größer als bei der Kontrolle. In diesem Gewebe wies Limonin eine geringe Aktivität als Enzym-Induktionsmittel auf (um den Faktor 1,33 und 1,36 höher als bei der Kontrolle).

Die Wirksamkeit als Inhibitoren von durch BP induzierten Vormagen-Tumoren bei ICR/Ha-Mäusen stand in positiver Korrelation zu der Enzym-induzierenden Aktivität dieser Verbindungen. Die folgende Tabelle II zeigt die Inhibierungseffekte von Limonin und Nomilin auf durch BP induzierte Neoplasie des Vormagens bei Mäusen. Bei einer Dosis von 10 mg wiesen 72% der Tiere Tumoren auf, verglichen mit 100% der Tiere in der Kontrollgruppe. Als positive Kontrolle wurde in diesem Versuch der bekannte Inhibitor BHA verwendet. In dieser Gruppe wiesen 69% der Tiere, wie gefunden wurde, Vormagen-Tumore auf. Die Inhibierung durch sowohl 10 mg Nomilin als auch 7,5 mg BHA war signifikant verschieden von derjenigen der Kontrolle. Die Anzahl der Tumoren pro Maus war ebenfalls signifikant vermindert in der 10 mg Nomilin-Gruppe. Die 5 mg Nomilin-Gruppe war von der Kontrollgruppe statistisch nicht verschieden, obgleich eine geringe Abnahme der Anzahl der Tiere mit Tumoren festzustellen war. Die gleichen Ergebnisse wurden erhalten mit den beiden Dosiswerten von Limonin.

Die folgenden Tabellen III und IV zeigen, wie einige Arten der Limonoide die GST-Aktivität auf Geweben von Dünndarm-Schleimhaut und Leber induzieren.

Diskussion

Es wurde gefunden, daß eine beträchtliche Anzahl von Inhibitoren der chemischen Carcinogenese eine erhöhte Aktivität des detoxifizierenden Enzyms GST induziert. Die Ergebnisse dieser Untersuchung bestätigen ferner die Korrelation zu den in der Natur vorkommenden Limonoiden. Die Enzym-induzierenden und Carcinogenese – inhibierenden Wirkungen von Nomilin lagen, wie gefunden wurde, in der gleichen Größenordnung wie diejenigen von BHA bei den in diesem Versuch angewendeten Dosen. Da das Molekulargewicht von Nomilin dreimal höher ist als dasjenige von BHA wird die biologische Aktivität des erstgenannten als höher angenommen als diejenige des phenolischen Antioxidationsmittels, bezogen auf Molbasis. Eine längere Diät-Verabreichung dieser Limonoide kann eine bessere Inhibierungswirkung gegenüber der durch BP induzierten Neoplasie ergeben.

Nomilin, ein wirksamerer Inhibitor der chemischen Carcinogenese als Limonin liegt in Citrus-Säften in einer geringeren Konzentration als die zuletztgenannte Verbindung vor. Das Verhältnis von Limonin zu Nomilin in Citrus-Säften hängt von einer Reihe von Faktoren ab, welche die Art der Frucht, die Erntezeit, die Zeit nach der Herstellung des Saftes und den Umstand, ob der Saft einer Wärmebehandlung unterzogen worden ist, umfassen. Im allgemeinen ist die Konzentration des Limonins 5- bis 10mal höher als diejenige von Nomilin. Der bittere Geschmack von Limonin kann festgestellt werden, wenn seine Konzentration in dem Saft mehr als 6 ppm beträgt. Der generelle Verzehr an diesen beiden Limonoiden ist daher nicht sehr hoch. Vorläufige Daten in bezug auf andere Limonoide mit einer verwandten Struktur zeigten jedoch eine ähnliche enzyminduzierende Aktivität an. Es wird angenommen, daß diese Verbindungen ebenfalls wirksame chemoprophylaktische Agen-

ten sind. Der kumulative Effekt von Limonoiden und Limonoid-artigen Naturprodukten kann somit wesentlich sein.

Limonoid-Glucosid wird im Darm hydrolysiert durch einen Virus unter Bildung der entsprechenden Limonoi-
de, die in dem Darm absorbiert werden. Das Limonoid-Glucosid ist in Wasser löslich und nicht so bitter. Dies ist
5 der Grund dafür, warum das Glucosid erfindungsgemäß leichter verwendbar ist.

Tabelle I

Wirkungen von Limonin, Nomilin und butyliertem Hydroxyanisol auf die Aktivität der
Glutathion-S-Transferase in Geweben von weiblichen ICR/Ha-Mäusen

Untersuchte Verbindungen	Dosis ^{b)} (mg)	Leber		Dünndarm-Schleimhaut	
		GST-Aktivität ^{c)} ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ Protein)	Verhältnis (Test/ Kontrolle)	GST-Aktivität ^{c)} ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ Protein)	Verhältnis (Test/ Kontrolle)
Kontrolle	—	1.15 ± 0.19	—	0.33 ± 0.04	—
BHA ^{a)}	7.5	$5.24 \pm 0.6^d)$	4.55	$1.08 \pm 0.03^d)$	3.25
Limonin	5	1.29 ± 0.35	1.12	$0.45 \pm 0.08^f)$	1.33
Limonin	10	1.24 ± 0.23	1.08	$0.45 \pm 0.09^f)$	1.36
Nomilin	5	$2.86 \pm 0.60^e)$	2.48	$1.00 \pm 0.03^d)$	3.00
Nomilin	10	$3.96 \pm 0.81^e)$	3.44	$1.39 \pm 0.15^d)$	4.17

^{a)} 3-tert-Butyl-4-hydroxyanisol (Sigma Chemical Co., umkristallisiert aus Hexanen/Aceton).

^{b)} Limonin und Nomilin wurden in Form einer feinen Suspension in 0,3 ml Baumwollsaamenöl verabreicht. BHA war in Baumwollsaamenöl leicht löslich. Als Kontrolle wurde nur Baumwollsaamenöl verabreicht.

^{c)} Die GST-Aktivität wurde bestimmt nach der Methode von Habig et al. unter Verwendung von CNDB als Substrat, Mittelwert \pm S. D. ($n = 3$).

^{d)} $P < 0,001$.

^{e)} $P < 0,005$.

^{f)} $P < 0,05$.

Tabelle II

Wirkungen von Limonin und Nomilin auf die durch BP induzierte Neoplasie des Vermögens von ICR/Ha-Mäusen^{a)}

Untersuchte Verbindungen	Dosis ^{b)} (mg)	Anzahl der Mäuse ^{c)}	Anzahl der Mäuse mit Tumoren ^{d)}	Prozent der Mäuse mit Tumoren	Anzahl der Tumore/Mäuse ^{e)}
Kontrolle	—	18	18	100	3.6 ± 0.8 (3.6 ± 0.8)
BHA	7.5	16	11	69 ^{f)}	1.7 ± 0.4 ^{g)} (2.5 ± 0.4)
Limonin	5	16	14	88	3.1 ± 0.8 (3.5 ± 0.8)
Limonin	10	19	16	84	2.5 ± 0.6 (3.0 ± 0.7)
Nomilin	5	18	15	83	2.3 ± 0.4 (2.7 ± 0.4)
Nomilin	10	19	13	72 ^{f)}	1.7 ± 0.4 ^{g)} (2.3 ± 0.4)

^{a)} BP (1 mg/0,2 ml Maisöl) wurde durch p.o.-Intubation zweimal pro Woche 4 Wochen lang verabreicht.

^{b)} Die Inhibitoren in 0,3 ml Maisöl in Form einer homogenen Lösung (BHA) oder in Form einer feinen Suspension wurden durch p.o.-Intubation dreimal pro Woche 4 Wochen lang verabreicht.

^{c)} Dies gibt die effektive Anzahl der Mäuse bei Beendigung des Versuchs an.

^{d)} Alle Tumore von >0,5 mm sind darin enthalten.

^{e)} Mittelwert ± S. E. Die Zahlen in Klammern geben die Anzahl der Tumore pro Tumor-trager der Maus an.

^{f)} P < 0,025.

^{g)} P < 0,05.

Tabelle III

Dünndarm-Schleimhaut

Untersuchte Verbindung	Dosis (mg)	GST-Aktivität (µmol/min/mg Protein)	Verhältnis Test/Kontrolle	P
Nomilin	10	2.09 ± 0.32	2.77	<0.005
Deacetylnomilin	10	0.80 ± 0.10	1.06	>0.4
Obacunon	10	1.24 ± 0.05	1.65	<0.001
Issobacunonsäure	10	1.26 ± 0.06	1.67	<0.001
Limonol	10	0.89 ± 0.10	1.18	>0.05
Deoxylimonin	10	0.74 ± 0.03	0.98	>0.50
Ichangin	10	1.10 ± 0.20	1.45	<0.05
Kontrolle	—	0.75 ± 0.02	—	

Tabelle IV

Leber

5	Untersuchte Verbindung	Dosis (mg)	GST-Aktivität ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ Protein)	Test/Kontrolle	P
	Nomilin	10	6.05 ± 1.08	2.74	< 0.005
10	Deacetylnomilin	10	3.12 ± 0.62	1.41	> 0.05
	Obacunon	10	5.55 ± 0.76	2.51	< 0.005
	Issobacunonsäure	10	7.77 ± 0.39	3.52	< 0.001
	Limonol	10	2.65 ± 0.45	1.20	> 0.20
	Deoxylimonin	10	2.31 ± 0.21	1.05	> 0.50
15	Ichangin	10	4.04 ± 0.69	1.83	< 0.02
	Kontrolle	—	2.21 ± 0.21	—	

20 Die Erfindung wurde zwar vorstehend unter Bezugnahme auf spezifische bevorzugte Ausführungsformen näher erläutert, es ist jedoch für den Fachmann selbstverständlich, daß sie darauf keineswegs beschränkt ist, sondern daß diese in vielfacher Hinsicht abgeändert und modifiziert werden können, ohne daß dadurch der Rahmen der vorliegenden Erfindung verlassen wird.

Patentansprüche

- 25
1. Pharmakologische Zusammensetzung, **dadurch gekennzeichnet**, daß sie eine therapeutisch wirksame Menge eines Citrus-Limonoids und einen pharmakologisch akzeptablen Träger enthält.
 2. Zusammensetzung nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß es sich bei dem Citrus-Limonoid um Limonin oder Nomilin handelt.
 - 30 3. Zusammensetzung nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß es sich bei dem Citrus-Limonoid um ein Glucosid desselben handelt.
 4. Verwendung der pharmakologischen Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 1 bis 3 in einem Verfahren zur Behandlung eines Tumors, bei dem einem Patienten, der an einem Tumor leidet, eine therapeutisch wirksame Menge eines Citrus-Limonoids verabreicht wird.
 - 35 5. Verwendung eines Citrus-Limonoids als Antitumor-Mittel.
- 40
- 45
- 50
- 55
- 60
- 65

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☒ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☒ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☒ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.